

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Odjel za biologiju  
Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Martina Mustać

## **RNA interferencija u genskoj terapiji**

Završni rad

Osijek, 2018.

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**  
**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**  
**Odjel za biologiju**  
**Preddiplomski sveučilišni studij Biologija**  
**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti  
**Znanstveno polje:** Biologija

**Završni rad**

## **RNA INTERFERENCIJA U GENSKOJ TERAPIJI**

**Martina Mustać**

**Rad je izrađen na:** Odjel za biologiju

**Mentor:** Dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac, doc.

**Komentor:** -

**Neposredni voditelj:** -

**Kratak sažetak završnog rada:** Male interferirajuće RNA (siRNA), RNA sa strukturom ukosnice (shRNA) i mikro RNA (miRNA) nekodirajuće su molekule koje imaju važnu ulogu u regulaciji ekspresije gena. Ove molekule se koriste kao posrednici u terapijskom liječenju različitih bolesti kao što su infekcije i tumori. Sve tri molekule su dvolančane RNA molekule koje posredovanjem u procesu RNA interferencije rezultiraju utišavanjem gena komplementarnim sparivanjem s ciljnom mRNA molekulom. Ove se RNA molekule suočavaju sa sličnim preprekama tijekom RNAi: slaba stabilnost *in vivo*, poteškoće u isporuci molekule zbog barijera te neželjeni efekti koji ne rezultiraju utišavanjem gena. Najveći napredak u rješavanju tih nedostataka leži u dizajniranju sintetičkih molekula s poboljšanim karakteristikama, kemijskim modifikacijama te vektorima za isporuku molekula u ciljne stanice. Rezultati RNAi pokazuju da će terapije bolesti ovim metodama imati i široku primjenu u budućnosti.

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** siRNA, miRNA, shRNA, terapeutici, tumor

**Rad je pohranjen:** na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

**BASIC DOCUMENTATION CARD****Bachelor thesis****Josip Juraj Strossmayer University of Osijek****Department of Biology****Undergraduate university study programme in Biology****Scientific Area:** Natural sciences**Scientific Field:** Biology**RNA INTERFERENCE IN GENETIC THERAPY****Martina Mustać****Thesis performed at:** Department of Biology**Supervisor:** Ivna Štolfa Čamagajevac, Asst. Prof.**Cosupervisor:-****Assistant Supervisor:-**

**Short abstract:** Small interfering RNA (siRNA), short hairpin RNA (shRNA) and micro RNA (miRNA) are non-coding molecules that play an important role in regulation of gene expression. These molecules are used as intermediates in the therapeutic treatment of various diseases such as infections and tumours. All three molecules are double-stranded RNA molecules that by mediating in the RNA interference process result in the suppression of the gene by complementary coupling with the target mRNA molecule. These RNA molecules face similar obstacles during RNAi: weak *in vivo* stability, difficulty in delivery of the molecule due to barrier, and unwanted effects that do not result in the suppression of the gene. The greatest advance in addressing these shortcomings lies in the design of synthetic molecules with improved characteristics, chemical modifications, and vector delivery molecules in the target cell. The results of RNAi show that disease therapy with these methods will also be widely used in the future.

**Original in:** Croatian**Key words:** siRNA, miRNA, shRNA, therapeutics, cancer

**Thesis deposited:** on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

## SADRŽAJ:

1.UVOD: .....	1
2. siRNA.....	1
2.1. Utišavanje gena posredovanjem siRNA molekule .....	1
2.2. Odabir lanca .....	2
3. miRNA .....	3
3.1. Utišavanje gena posredovanjem miRNA molekule .....	3
3.2. miRNA inhibitori .....	4
4. shRNA.....	5
4.1. shRNA mehanizam .....	5
4.2. Bifunkcionalna shRNA .....	6
5. KEMIJSKE MODIFIKACIJE.....	8
5.1. Modifikacija 2'-OH riboze.....	8
5.2. LNA i UNA modifikacije.....	8
5.3. Fosforotiolat (PS) modifikacija.....	9
6. PREPOZNAVANJE mRNA PUTEM siRNA i miRNA.....	10
7. ISPORUKA siRNA I miRNA TERAPEUTIKA .....	12
7.1. Virusni vektori .....	13
7.2. Nevirusni vektori.....	14
8. siRNA I miRNA U KLINIČKIM ISTRAŽIVANJIMA .....	15
8.1. Tumor.....	15
8.2. siRNA i tumor.....	16
8.3. miRNA i tumor .....	16
9. ZAKLJUČAK .....	17
10. LITERATURA.....	19

## 1.UVOD:

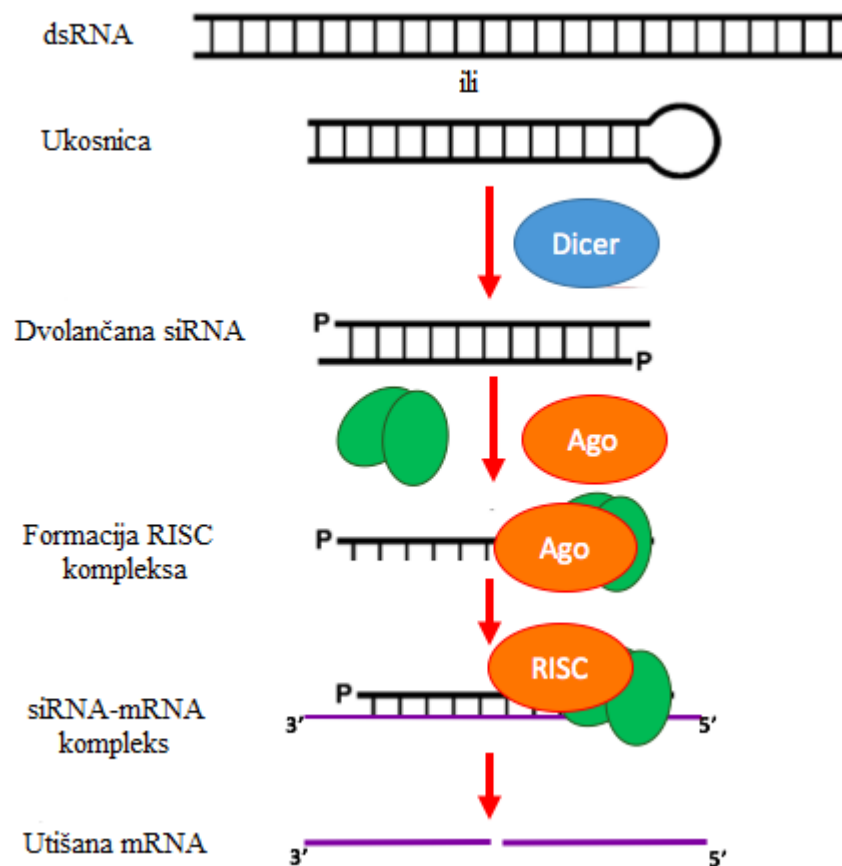
RNA interferencija (RNAi) je biološki stanični proces koji utišava ekspresiju gena tako da potiče degradaciju ciljne mRNA (glasničke RNA) molekule. Ovaj proces ima važnu ulogu u regulaciji ekspresije ciljnih gena te obrani protiv različitih bolesti, pa čak i tumora. Male interferirajuće RNA (siRNA), kratke RNA sa strukturom ukosnice (shRNA) i mikro RNA (miRNA) molekule imaju veliki potencijal za otkrivanje i razvoj mnogih lijekova te primjenu kao kliničkih terapeutika. siRNA i miRNA molekule najviše su istraživane za svrhu terapeutika u liječenju različitih tipova tumora. Sve tri molekule (siRNA/shRNA/mRNA) dvolančane su RNA molekule koje posredovanjem u procesu RNA interferencije rezultiraju utišavanjem ciljnih gena tako da se komplementarno spare sa ciljnom mRNA molekulom. No, miRNA može utišati različite ciljne mRNA zbog njezine djelomične komplementarnosti sa ciljnim mRNA molekulama, dok ostale dvije molekule utišavaju samo jednu ciljnu mRNA zbog gotovo potpune komplementarnosti sa ciljnom mRNA molekulom. Međutim, ove se RNA molekule suočavaju sa sličnim preprekama: imaju slabu stabilnost *in vivo*, poteškoće u isporuci molekule zbog staničnih barijera te se mogu javiti i neželjeni efekti koji ne rezultiraju utišavanjem gena što nije cilj RNA interferencije. Stoga kako bi se njihove karakteristike i isporuka poboljšale, a neželjeni efekti reducirali, koriste se strategije kao što su kemijske modifikacije 2'-OH skupine, LNA i UNA modifikacije te fosforotioat (PS) modifikacije.

## 2. siRNA

### 2.1. Utišavanje gena posredovanjem siRNA molekule

Dvolančana RNA (dsRNA) molekula koja je uvedena u stanice ili prepisana od staničnih gena, najprije se procesira ribonukleazom Dicer-om koja se nalazi u citoplazmi. Takva kratka dsRNA molekula poznata je kao siRNA molekula i ima 21-23 nukleotida s 2 do 3 nukleotida koji se nalaze na 3' kraju (Lam i sur. 2015). siRNA molekula tada stupa u interakciju s RNA induciranim utišavajućim kompleksom (RISC, engl. *RNA-induced silencing complex*) te ga aktivira (Sarret i sur. 2015). Argonaut 2 (AGO2) je endonukleaza i komponenta RISC-a koja cijepa prolazni lanac (engl. *passenger strand*) siRNA molekule dok će vodeći lanac (engl. *guide strand*) ostati povezan s RISC-om (Lam i sur. 2015). Vodeći lanac navodi aktivirani kompleks RISC-a do ciljne mRNA molekule da bi je, na kraju,

protein Argonaut 2 (AGO2) pocijepao. Samo se vodeći lanac siRNA molekule veže na ciljnu mRNA molekulu koja je potpuno komplementarna vodećem lancu te prema tome, siRNA uzrokuje specifično utišavanje gena i degradaciju određene ciljne mRNA molekule (Slika 1.) (Sarret i sur. 2015).



Slika 1. Mehanizam utišavanja gena (ciljne mRNA) posredovan siRNA molekulom: dsRNA (umjetno uvedena u stanice ili prepisana od staničnih gena) procesira se pomoću enzima Dicer-a u siRNA molekulu koja se tada veže na kompleks RISC. Protein Argonaut 2 (AGO2) cijepa prolazni lanac siRNA molekule, a vodeći lanac navodi RISC kompleks prema ciljnoj mRNA molekuli. Komplementarno vezanje između vodećeg lanca siRNA i ciljne mRNA dovodi do cijepanja mRNA molekule (Web 1).

## 2.2. Odabir lanca

Da bi siRNA terapija bila uspješna, siRNA molekula mora biti pravilno orijentirana i ugrađena u AGO protein RISC kompleksa kako bi se tzv. prolazni lanac mogao pocijepati te otpustiti, a vodeći lanac komplementarno vezati s ciljnom mRNA molekulom. Tijekom vezanja siRNA molekule s AGO proteinom specifično se prepoznaje vodeći lanac iako se

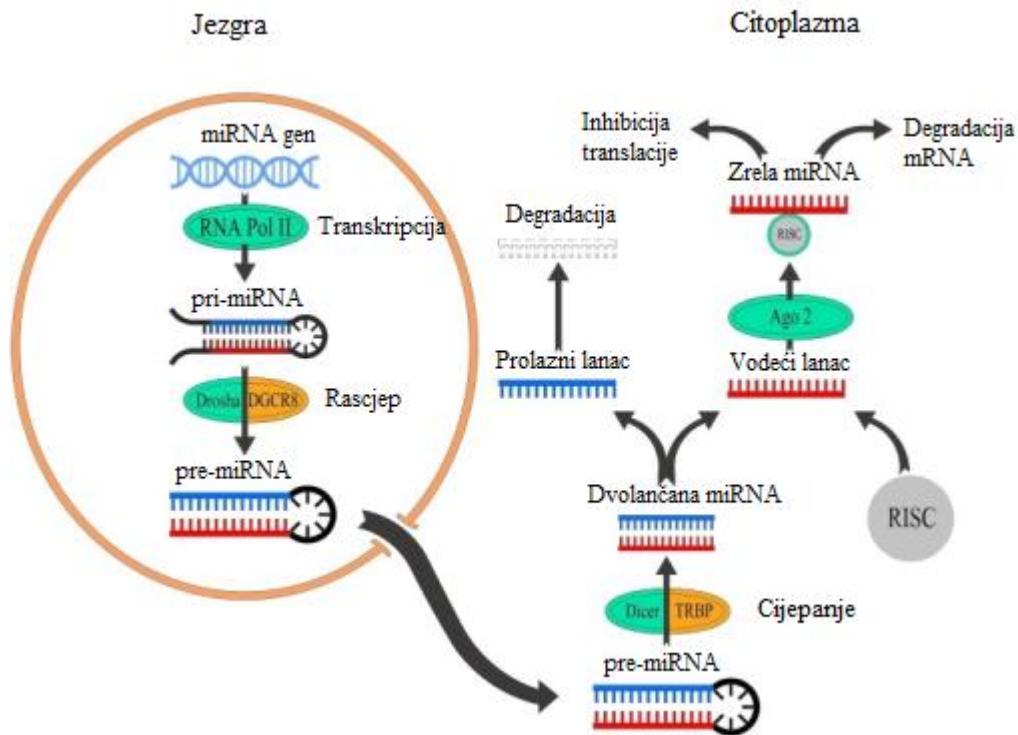
oba lanca dvolančane RNA molekule mogu potencijalno vezati na AGO protein. Uslijed nepravilne orijentacije može doći do cijepanja vodećeg lanca pri čemu se, prolazni lanac veže s AGO proteinom što može dovesti do neželjenih efekata jer se prolazni lanac može komplementarno spariti s drugom mRNA molekulom. Termodinamička stabilnost krajeva i jednog i drugog lanca pridonosi odabiru lanca koji će protein AGO degradirati. Lanac s nestabilnim 5' krajem (onaj koji ima veći sadržaj adenin/uracil baza) odabire se kao vodeći lanac, a lanac koji ima stabilniji 5' kraj cijepa se kao prolazni lanac. Stoga bi se dvolančane RNA molekule trebale konstruirati s vodećim lancem koji je nestabilniji na 5' kraju, odnosno s uracilom ili adeninom na 5' kraju kako bi se smanjila mogućnost odabira pogrešnog lanca (Lam i sur. 2015).

### **3. miRNA**

#### **3.1. Utišavanje gena posredovanjem miRNA molekule**

miRNA molekule su kratke nekodirajuće molekule koje su građene 19-22 nukleotida. RNA polimeraza II u jezgri obavlja transkripciju gena kojom nastaje primarna miRNA molekula (pri-miRNA). Pri-miRNA na 3' kraju ima poliadenilatni rep, na 5' kraju ima gvanozinsku kapu, dvolančana je molekula i ima strukturu ukosnice. Mikroprocesorski kompleks kojim se cijepa pri-miRNA sadrži protein koji se naziva Drosha te dvolančanu RNA vezujuću domenu proteina DGCR8. Nakon cijepanja nastaje prekursora miRNA molekula (pre-miRNA) koja je također dvolančana, sadrži od 70 do 100 nukleotida i ima strukturu ukosnice (Lam i sur. 2015; Ros i Gu 2016). pre-miRNA molekula zatim se transportira iz jezgre u citoplazmu pomoću proteina eksportina 5-Ran-GTP kompleksa te se tamo dalje procesira pomoću enzima Dicer-a u dvolančanu miRNA molekulu koja se sastoji od 18 do 22 nukleotida. Tada se miRNA molekula povezuje s RISC kompleksom te tako stvara miRISC kompleks. Dvolančana miRNA se zatim odmotava, otpušta i odbacuje prolazni lanac. Jednolančana miRNA navodi miRISC kompleks prema ciljnim mRNA molekulama te se za njih veže djelomičnim sparivanjem komplementarnih baza. Na kraju dolazi do utišavanja ciljnog gena degradacijom, cijepanjem ili translacijskom represijom ciljne mRNA molekule (Slika 2) (Lam i sur. 2015; Pekarik 2005). U dodatku na uobičajeni 3'-UTR mehanizam, miRNA molekule mogu djelovati na različite načine. Let-7 miR-363 mogu aktivirati mRNA ekspresiju proteina koji su utišani tijekom procesa stanične

proliferacije. To se omogućuje tako da se micro-RNP proteini (slični AGO proteinima) navode prema sekvencama koje su bogate adeninom i uracilom unutar mRNA 3'-UTR. Nadalje, miRNA molekule mogu ciljati sekvence koje su poput 3'-UTR 5'-UTR sekvenca. miR-551b-3p regulira ekspresiju STAT3 tako da se komplementarno veže na njegove sekvence. miR-1 u mišićima može stimulirati mitohondrijsku translaciju nekih DNA kodirajućih transkripta i istodobno u citoplazmi utišavati DNA kodirajuće mete (Shah i sur. 2016).



Slika 2. Mehanizam utišavanja gena (ciljne mRNA) posredovanjem miRNA molekule: miRNA: Transkripcija miRNA gena se odvija u jezgri pomoću RNA polimeraze II kako bi nastala pri-miRNA molekula, koja se cijepa pomoću proteina Drosh-e i nastaje pre-miRNA molekula. Pre-miRNA se transportira eksportinom 5-Ran-GTP kompleksom u citoplazmu gdje se pomoću ribonukleaze Dicer-a procesira u miRNA. miRNA se veže na RISC kompleks, prolazni lanac se odbaci i tada vodeći lanac navodi miRISC kompleks prema ciljnoj mRNA djelomičnim komplementarnim vezanjem. Rezultat posredovanja miRNA molekule je translacijska represija uslijed degradacije ili cijepanja mRNA (Web 2).

### 3.2. miRNA inhibitori

Onkogene miRNA koje su kod ljudi nekada previše eksprimirane moraju biti inhibirane miRNA inhibitorima. To su komplementarni jednolančani oligonukleotidi koji djeluju na endogenu miRNA tako da poprimi konformaciju u kojoj se neće moći vezati na RISC kompleks. To su anti-miR oligonukleotidi (engl. *anti-miRs oligonucleotides*), antagomiri (engl. *antagomirs*), zatvorene nukleinske kiseline (LNA) anti-miRNA (engl.



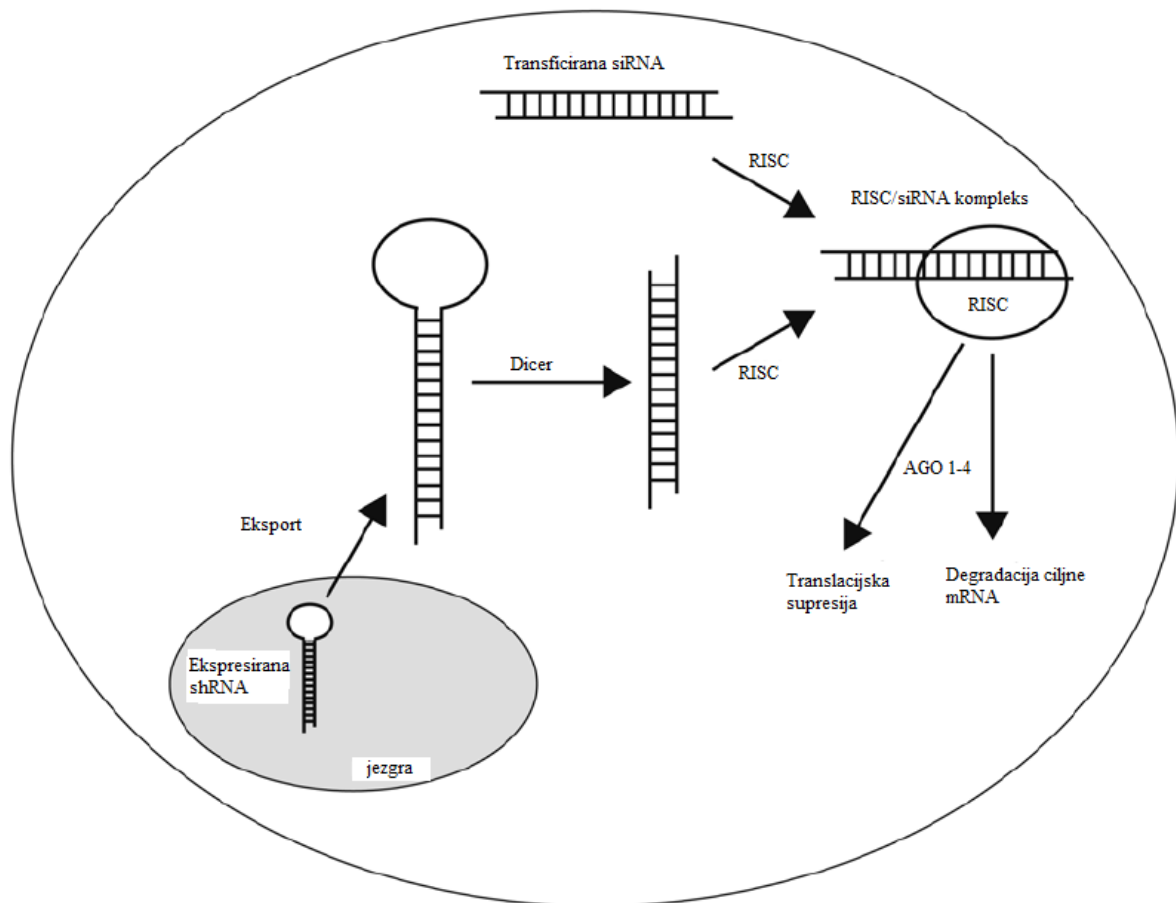
*locked nucleic acid (LNA) anti-miRNAs*), miRNA maske (engl. *mi-RNA masks*), mi-RNA spužve (engl. *mi-RNA sponges*), male inhibitorske molekule miRNA i tzv. SMIR's (engl. *small molecules inhibitors of miRNA*). Antagomiri su jednolančane RNA molekule koje su komplementarne ciljnoj miRNA molekuli te su kemijski modificirane. Kemijskim modifikacijama poboljšava se njihova stabilnost i spječava degradacija. Anti-miRNA oligonukleotidi su kemijski modificirani nekodirajući, jednolančani oligonukleotidi koji su komplementarni određenoj miRNA molekuli. Anti-miRNA su kompetitivni inhibitori i rade tako da inhibiraju interakciju miRNA molekule sa ciljnom mRNA molekulom. U zatvorenim nukleinskim kiselinama (LNA) anti-miRNA metilenski most koji povezuje 2'-O atom i 4'-C atom zatvara ribozni prsten u C2'-endo ili C3'-endo konformaciji. miRNA spužve sadržavaju vezujuća mjesta za miRNA koja su u kompeticiji sa endogenim miRNA metama za miRNA vezanje. SMIR molekule su također mali inhibitori miRNA molekula. Funkcija ovih molekula je selektivno onemogućivanje interakcije miRNA i ciljne mRNA molekule ili inhibiranje miRNA biogeneze. Primjerice, mala molekula enoksacin povećava produkciju tumor supresorskih miRNA vezanjem na miRNA biosintetski protein koji se naziva TAR RNA vezujući protein 2 (TRBP). Nadalje, PLL (engl. *polylysine*) i TPF (engl. *trypaflavine*) onemogućavaju interakciju miRNA-RISC i povećavaju antitumorsku aktivnost. Na taj način ove male regulatorne molekule miRNA kontroliraju aktivnost dereguliranih ili previše eksprimiranih onkogenih miRNA molekula (Shah i sur. 2016).

## **4. shRNA**

### **4.1. shRNA mehanizam**

Kratke RNA molekule sa strukturom ukosnice (shRNA molekule) također se mogu koristiti da bi se postigao efekt utišavanja ciljnih gena pomoću RNAi mehanizma. shRNA molekula sastoji se od 19 nukleotida s nekoliko nukleotida na 3' kraju. shRNA molekule se sintetiziraju u jezgri stanice pomoću polimeraze II ili III. One shRNA molekule koje se prepisuju polimerazom III U6 ili H1 promotora također imaju strukturu ukosnice i 2-5 nukleotida na 3' kraju (Pekarik 2005). Transkripcijom shRNA nastaje primarni transkript koji se zatim procesira u jezgri kompleksom koji sadrži Drosha-u, Rnazi III enzim i dvolančanu RNA vezujuću domenu proteina DGCR8. Taj kompleks omogućuje da se primarni transkript procesira u pojedinačne shRNA molekule. Procesirani primarni transkript se naziva pre-shRNA molekula koji se transportira u citoplazmu uz pomoć proteina

eksportina 5 mehanizmom koji se naziva Ran-GTP ovisni mehanizam. U citoplazmi se pre-shRNA molekula ugrađuje u drugi kompleks Rnaze III koji se sastoji od Dicer-a, TRBP/PACT domene i Rnaznog III enzima gdje se petlja ukosnice procesira kako bi nastala dvolančana siRNA molekula. Kompleks tada koordinira ugradnju na protein Argonaut 2 (AGO2). Nakon ugradnje i odvajanja prolaznog lanca, i siRNA i shRNA u kompleksu s RISC-om bi se zapravo trebale jednako ponašati (Slika 3.) (Rao i sur. 2009).

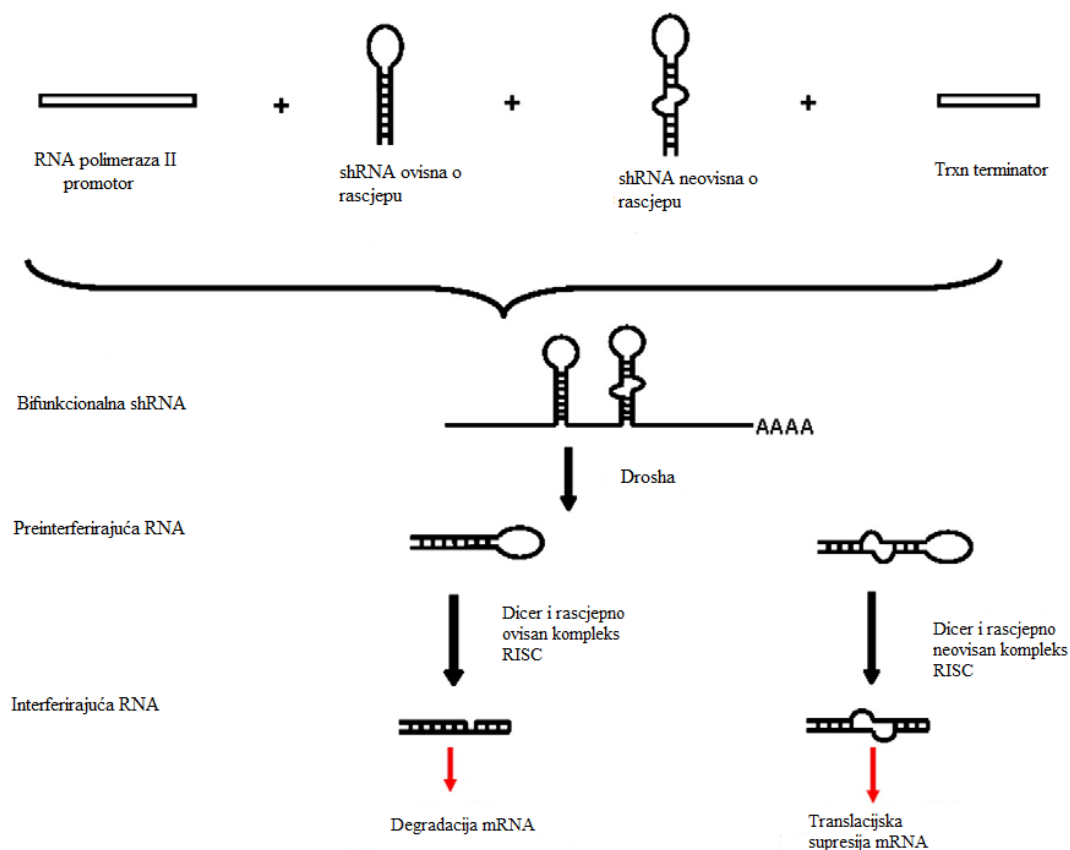


Slika 3. Mehanizam utišavanja gena posredovanjem shRNA molekule (Web 3).

#### 4.2. Bifunkcionalna shRNA

Postoji i treća RNAi opcija koja je u razvoju, a naziva se bifunkcionalna shRNA. shRNA molekule mogu biti konstruirane tako da se učinkovito ugrade na oba kompleksa RISC-a (onaj koji je ovisan o cijepanju i onaj koji je neovisan o cijepanju). Da bi to bilo moguće, procesiranje shRNA molekule mora biti posredovano dvama putevima koji su ovisni o pristupu cijepanja Rnaze H i/ili komplementarnosti lanca. Također, da bi došlo do ciljnog učinka utišavanja gena, ovisni su o interakciji s Imp8 (Importin 8). Istodobna

ekspresija obiju tipova bifunkcionalnih shRNA bi u stanicama trebala dostići veću izdržljivost u odnosu na siRNA, brže djelovanje na utišavanje gena u odnosu na shRNA molekule te veću učinkovitost. Bifunkcionalna shRNA molekula može istodobno potaknuti degradaciju i inhibirati translaciju ciljne mRNA molekule zbog mogućnosti vezanja na nekoliko tipova RISC kompleksa. Takozvani bifunkcionalni dizajn bi trebao zapravo biti učinkovitiji i to iz 2 razloga: 1) bifunkcionalnost bi trebala potaknuti ugradnju vodećeg lanca na dva tipa RISC-a da bi se povećala aktivnost, 2) ugradnjom na oba kompleksa RISC-a (ovisnog o cijepanju i neovisnog o cijepanju) ciljna mRNA može biti utišana i kroz mRNA degradaciju i translacijsku inhibiciju. Ekspresijska jedinica bifunkcionalne shRNA sastoji se od dvije strukturne petlje. Jedna petlja je sastavljena od potpuno komplementarnog vodećeg i prolaznog lanca za ugradnju na kompleks RISC koji je ovisan o cijepanju, dok je druga petlja sastavljena od nekomplementarnih prolaznih lanaca (pozicije 9-12) za ugradnju na RISC koji je neovisan o cijepanju (Slika 4.) (Rao i sur. 2009).



Slika 4. Mehanizam utišavanja gena posredovanjem bifunkcionalne shRNA molekule (Web 4).

## 5. KEMIJSKE MODIFIKACIJE

Kemijske modifikacije mogu utjecati na odabir lanca RNA molekula, umanjiti vezanje prolaznog lanca, povećati termalnu stabilnost, smanjiti toksičnost te reducirati neželjene efekte poput razgradnje nukleazama. Da bi se siRNA ili miRNA molekula koja je modificirana mogla u pravilnoj orijentaciji vezati na RISC kompleks, u obzir se moraju uzeti važni faktori: pozicija i tip modifikacije te efekt modifikacije na naboj dvolančane RNA molekule (Lam i sur. 2015; Ku i sur. 2015). 5' fosfat, 5' proksimalni dio i središnje pozicije vodećeg lanca važna su područja RNA molekule za interakciju i aktivaciju kompleksa RISC i AGO proteina. Nadalje, kemijske modifikacije na prolaznom lancu te na 3' proksimalnom kraju vodećeg lanca imaju najmanji utjecaj na specifičnost i funkciju RNA molekule (Lam i sur. 2015). Tipovi kemijskih modifikacija koji se najviše istražuju na siRNA i miRNA su : 1) modifikacija 2'-OH riboze, 2) zatvorene i otvorene nukleinske kiseline, 3) fosforotioatna (PS) modifikacija (Ku i sur. 2015).

### 5.1. Modifikacija 2'-OH riboze

Modifikacija 2'-OH riboze je najpoznatiji tip modifikacije dvolančane RNA jer aktivnost utišavanja gena siRNA ili miRNA uopće ne ovisi o toj skupini. Ova modifikacija uključuje supstituciju ribozne 2'-OH skupine sa skupinama kao što su 2'-O-metil (2'-O-Me), 2'-metoksietil (2'-O-MOE) i 2'-fluoro (2'-F). Ovakve modifikacije mogu poboljšati stabilnost RNA molekula u serumu. 2'-O-metil (2'-O-Me) modifikacija povećava otpornost na termalnu stabilnost i razgradnju enzimima. 2'-fluoro (2'-F) modifikacija povećava stabilnost molekule u serumu i afinitet vezanja RNA molekula na kompleks RISC (Ku i sur. 2015). Također, supstitucije samo na stranama s uracilom s 2'-O-Me ili 2'-F mogu spriječiti imune odgovore bez utjecaja na stabilnost i snagu siRNA. Ovako modificirane RNA molekule neprepoznatljive su za TLR 7/8 (engl. *Toll-like receptor* 7/8) koji je odgovoran za imunu reakciju (Slika 5.) (Lam i sur. 2015).

### 5.2. LNA i UNA modifikacije

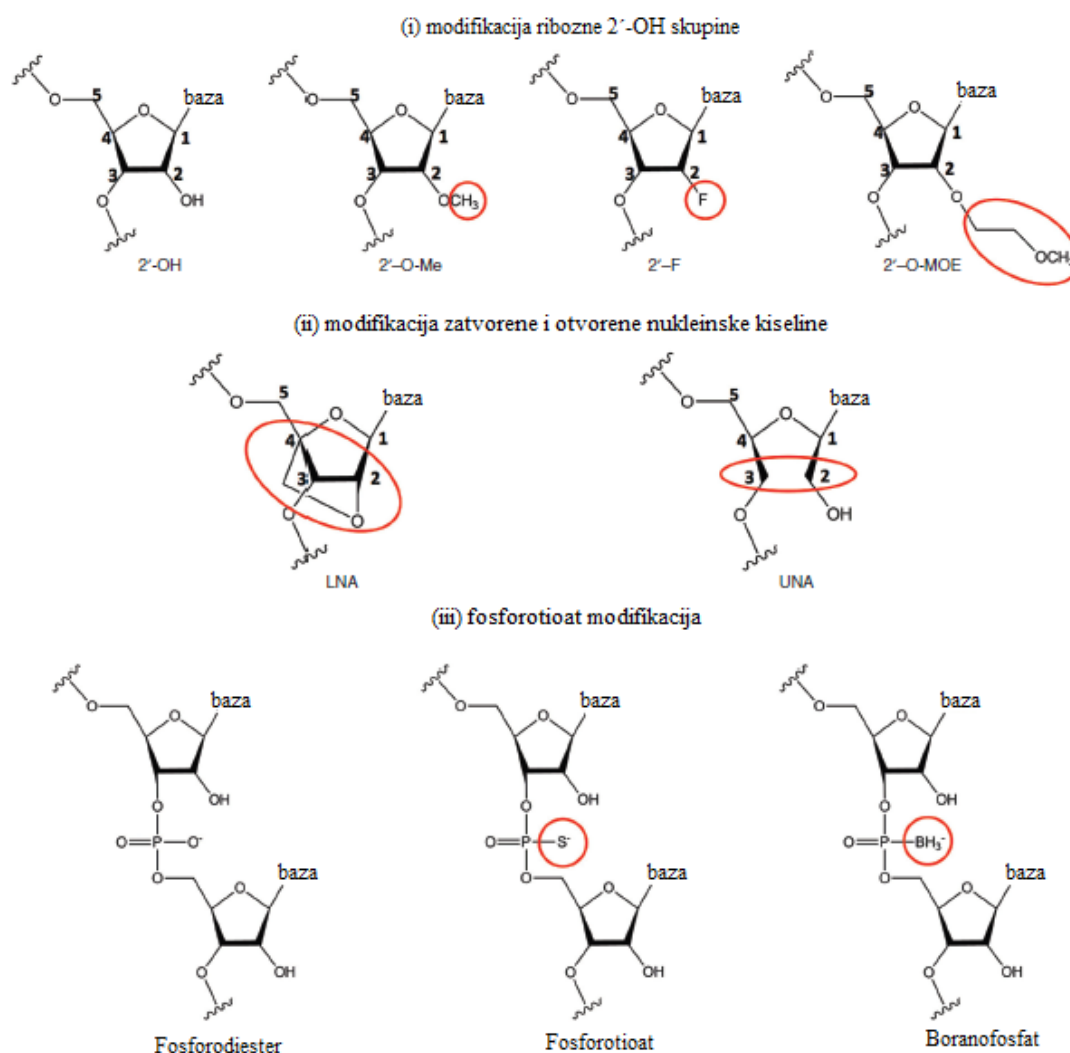
Zatvorena nukleinska kiselina (LNA) kemijski je tip modificirane nukleinske kiseline gdje se između 2'-O i 4'-C atoma nalazi metilenski mosti i na taj način tvori zatvorenu konformaciju prstena. Zapravo je ova modifikacija alternativna 2'-OH

modifikacija. No, između 2'-O i 4'-C može se nalaziti i etilenski most pa se takva modifikacija naziva nukleinska kiselina s etilenskim mostom (ENA). Ovakve modifikacije povećavaju termalnu stabilnost molekula. Modifikacija na položaju 10,12 i 14 od 5' kraja nekodirajućeg lanca siRNA molekule smanjuje njezinu aktivnost zbog steričkih i konformacijskih promjena u blizini mjesta cijepanja. Tako može doći do krivog odabira lanca za ugradnju u kompleks RISC jer ova modifikacija na 5' kraju onemogućuje ugradnju prolaznog lanca u kompleks. LNA modifikacija na 3' kraju štiti siRNA ili miRNA molekulu od 3' egzonukleaza i povećava njezinu stabilnost u serumu (Slika 5.) (Ku i sur. 2015).

Otvorene (UNA) modificirane nukleinske kiseline acilni su derivati RNA u kojima nedostaju C2' i C3' veze u RNA riboznom prstenu, ali su strukturno slični nemodificiranoj RNA. RNA molekule dobro podnose UNA modifikacije koje poboljšavaju učinak utišavanja te stabilnost *in vitro* i *in vivo*. No, dodatne modifikacije na vodećem lancu rezultiraju smanjivanjem učinkovitosti utišavanja destabilizacijom dvolančane siRNA ili interakcija sa ciljnom mRNA molekulom. Također, modifikacija u vodećem lancu može spriječiti neželjene efekte bez smanjivanja aktivnosti i snage siRNA molekule (Slika 5.) (Lam i sur. 2015).

### 5.3. Fosforotioat (PS) modifikacija

Ovakva modifikacija nastaje supstitucijom fosfodieterske veze s drugim tipovima veza. Najpoznatija modifikacija je ona u kojoj se jedan atom kisika fosfatne skupine zamjeni sumporovim atomom te nastaje fosforotioat (PS). Ova modifikacija povećava otpornost RNA molekula na nukleaze no čini fosforotioat toksičnim (Lam i sur. 2015). Modifikacija siRNA molekule na vodećem lancu (pozicije 3, 5 i 17) od 5' kraja povećava uspješnost efekta utišavanja gena tako da omogućuje bolje vezanje prolaznog lanca na RISC kompleks. Supstitucijom 2 kisikova atoma fosfatne skupine nastaje fosfoditotioat (PS2) koji je izrazito toksičan. S druge strane, kod boranofosfat modifikacije kisikov atom se zamjenjuje s boranom (BH3). Ovakva modifikacija boranom je otpornija na nukleaze i manje toksična od fosforotioata. (Slika 5.) (Ku i sur. 2015).

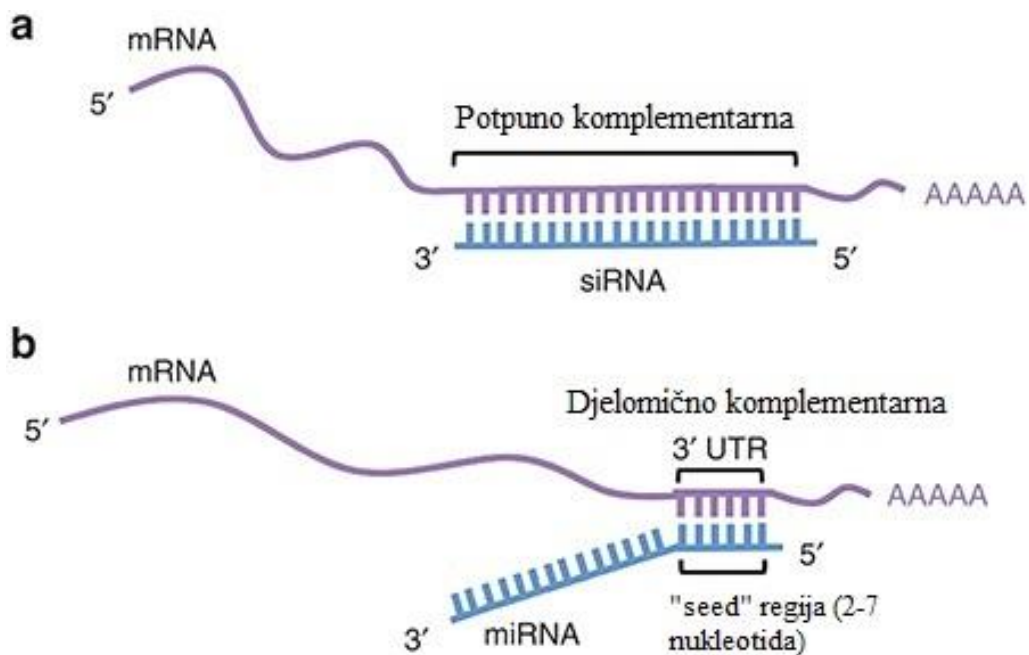


Slika 5. Kemijske modifikacije-(i) modifikacija 2'-OH skupine riboze – 2' –OH skupina je modificirana sa 2' –O-metil (2' O-Me), 2' –fluoro (2' –F) ili 2' –metoksietil (3' –O-MOE)., (ii) LNA i UNA modifikacije – riboza je zatvorena u C3' endokonformaciji uvođenjem 2' - O i 4'-C metilenskog mosta; ribozni prsten je pocjepan između 2'-O i 3'-C, (iii) fosforotiorat (PS) modifikacije – kisikov atom je zamjenjen sumporovim (fosfotionat) ili sa boranom (BH<sub>3</sub>) (boranofosforat) (Preuzeto i prilagođeno prema Lam i sur. 2015).

## 6. PREPOZNAVANJE mRNA PUTEM siRNA i miRNA

Da bi se potaknuo proces RNAi, siRNA molekula mora biti potpuno komplementarna ciljnoj mRNA molekuli. Komplementarno vezanje siRNA molekule aktivira protein Argonaut 2 (AGO2) koji cijepa fosfodietersku okosnicu mRNA molekule

između baza 10 i 11 na 5' kraju vodećeg lanca. Komplementarno sparivanje se između mRNA i miRNA događa na 3' kraju netranslatirane regije (UTR) mRNA i regije od 2-7 nukleotida od 5' kraja miRNA (Lam i sur. 2015). Ključna razlika između miRNA i siRNA molekula su krajevi njihovih lanaca. miRNA se ponašaju kao tradicionalni polimerski produkti aktivnost gena. Iako postoje male varijacije, mnogo vrsta miRNA molekula ima gotovo identične krajeve lanaca. siRNA molekule su raznolikije u genetskoj kompoziciji. Jedan lanac miRNA molekule može prepoznati mnoštvo mRNA molekula te zbog toga miRNA-mRNA prepoznavanje ne zahtjeva savršeno sparivanje. Zbog djelomičnog sparivanja komplementarnih baza između mRNA i miRNA, AGO2 protein (dio miRISC-a) nije aktiviran. Umjesto toga, utišavanje ciljne mRNA se događa putem translacijske represije ili degradacije deadenilacijom, skidanja kape ili egzonukleazne aktivnosti. S druge strane, siRNA molekula je potpuno komplementarna ciljnoj mRNA molekuli. (Slika 6.) (Carthew i Sontheimer 2009).

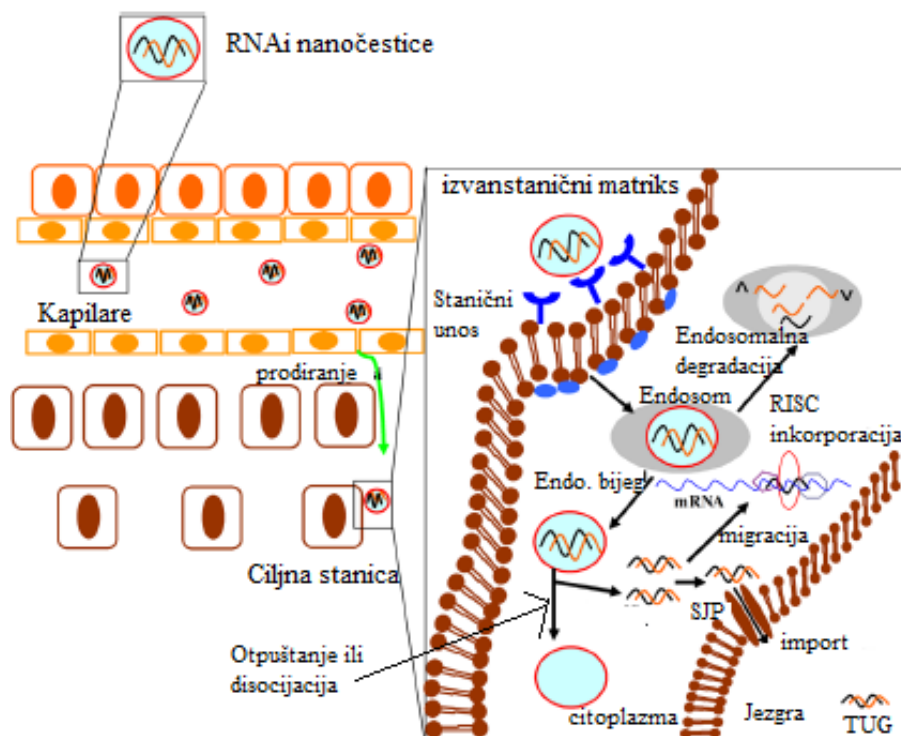


Slika 6. Prepoznavanje mRNA molekula putem siRNA i miRNA molekule – (a) siRNA je komplementarna ciljnoj mRNA molekuli, (b) miRNA je djelomično komplementarna ciljnoj mRNA molekuli, a sparivanje se događa na 5' kraju UTR ciljne mRNA molekule (Preuzeto i prilagođeno prema Lam i sur. 2015).

## 7. ISPORUKA siRNA I miRNA TERAPEUTIKA

Da bi se potaknuo proces RNAi i da bi rezultat procesa bio specifično utišavanje gena, siRNA i miRNA molekule se moraju isporučiti u citoplazmu ciljne stanice. Uloga sustava isporuke terapeutika je olakšavanje unosa terapeutskih molekula u stanice. Karakteristike ovih molekula kao što su hidrofilnost, negativni naboj i velika molekularna težina (~14-15 kDa), uzrok su slaboj permeabilnosti kroz biomembrane. Stanična membrana je gotovo posve nepropustljiva za siRNA molekulu zbog njezinog naboja i veličine. Također, ovaj sustav može zaštititi nukleinske kiseline od preuranjene degradacije nukleazama i time reducirati potrebu za kemijskim modifikacijama koje mogu utjecati na funkcionalnost i specifičnost RNA molekula. Kako siRNA i miRNA molekule imaju istu unutarstaničnu aktivnost (obje zahtijevaju enzimatsku funkciju kompleksa RISC-a spram ciljne mRNA) i slična fizikalno-kemijska svojstva (dvolančane RNA s 21-23 nukleotida), mogu se primijeniti slični načini isporuke ovih RNA molekula (Lam i sur. 2015). Idealan nosač gena trebao bi biti učinkovit, siguran, dugog trajanja i specifičan. Trebao bi selektivno i diferencijalno ciljati gene tumora i homogeno se rasporediti kroz tumorsko tkivo i penetrirati u stanice (Gao i Huang 2013). Također, nosač bi trebao imati dobru biokompatibilnost i nisku toksičnost. Da bi se RNA molekule mogle koristiti u kliničke svrhe, *in vivo*, nosač ne bi trebao biti veći od 200 nm da bi mogao proći kroz endotel kapilara niti manji od 6 nm jer se tada nanočestični nosači uklanjaju bubrežnom ekskrecijom. Trebao bi biti stabilan u krvi i štititi RNA molekule od degradacije. Nakon što stigne do ciljne stanice, nosač se veže na površinu stanice i prenosi RNA molekulu kroz membranu. Nakon toga slijedi odlazak iz endosoma zbog kiselog pH te nosač disocira u citosol (Slika 7.) (Gao i Huang 2013; Zahir i sur. 2018). Učinkovita metoda isporuke terapeutika *in vivo* u hepatocyte (stanice jetre) je hidrodinamička injekcija. siRNA molekula ima veću isporuku u stanice hepatocita i iznosi oko 60-70%, dok je za shRNA ova vrijednost na samo 20-40% učinkovitosti. No, utišavanje MDK (engl. *Midikine*) gena u jetri ovih dviju molekula iznosi do 50% kontrolne vrijednosti što znači da je učinkovitost utišavanja gena siRNA i shRNA molekula podjednaka. Prema tome, siRNA molekula je učinkovitiji klinički terapeutik zbog visoke uspješnosti isporuke u ciljne stanice (Takahashi i sur. 2009).





Slika 7. Glavne biološke barijere RNAi utišavanja gena SJP: sustav jezgrinih pora, TUG: transkripcijsko utišavanje gena (Preuzeto i prilagođeno prema Gao i Huang 2013).

## 7.1. Virusni vektori

Virusi koji se koriste da bi potaknuli RNA interferenciju su lentivirusi, adenovirusi, AAV (engl. *Adeno-associated virus*) virusi i bakulovirusi. Imaju visoku učinkovitost u transportu RNA kodirajućih vektora u jezgru da bi omogućili ekspresiju RNA molekule. Virusni vektori koji se koriste za prenošenje terapijske RNA su genetički programirani kako bi se uklonila njihova virulentnost. Dugotrajna ekspresija može se postići korištenjem virusa kao što su lentivirusi. Oni se mogu integrirati u genom domaćina. Međutim, postoje rizici kod korištenja virusnih vektora kao što je rizik od mutageneze i imune reakcije (kod adenovirusa) (Lam i sur. 2015). Retrovirusi imaju prednost u transdukciji siRNA molekula u stanice koje se aktivno dijele. Također, bakulovirusi i lentivirusi mogu prenositi velike količine genetičke informacije. No, veliki rizik korištenja virusnih vektora je mogućnost oštećenja organa (primjerice jetra kod adenovirusa) i stanica toksinima (Gao i Huang 2013). Istraživanje ekspresije shRNA molekula u jetri miševa posredovane AAV virusnim vektorom potvrdilo

je da virusni vektori mogu uzrokovati oštećenje organa toksinima (Grimm i sur. 2006). Rezultati istraživanja pokazali su da je došlo do oštećenja stanica jetre kod ekspresije čak 36 shRNA molekula, a 23 slučaja oštećenja završila su smrću miševa (Grimm 2009). Drugo istraživanje koje je također potvrdilo da virusni vektori mogu izazvati oštećenja toksinima je ekspresija shRNA molekule posredovana lentivirusnim vektorom u kulturi stanica. U kulturi stanica, koristeći virusnu transdukciju, došlo je do ekspresije shRNA molekule koja je utišala plazminogeni inhibitor aktivatora 2 (PAI-2). No, nakon samo 4 dana od transdukcije stanice su postale nezdrave, a nakon 10 dana nijedna od stanica nije bila živa (Fish i Kruithof 2004).

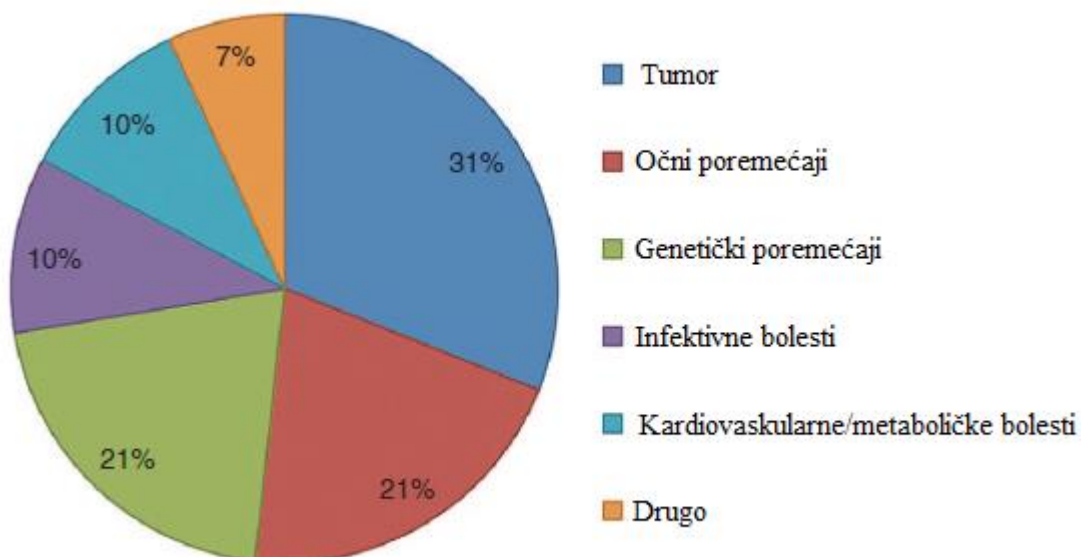
## 7.2. Nevirusni vektori

S druge strane, veliku pozornost dobivaju nevirusni vektori jer imaju visok potencijal u svladavanju poteškoća s isporukom. Najpoznatiji sustavi isporuke nevirusnim vektorima su kationski lipidni sustavi te sustavi koji su bazirani na polimerima koji uključuju liposome i nanočestice. Upravo njihova kationska priroda omogućuje stvaranje kompleksa s polianionskim nukleinskim kiselinama i interakciju s negativno nabijenim staničnim membranama (Gao i Huang, 2013). Kationski polimeri mogu s negativno nabijenom RNA molekulom stvarati poliplekse putem elektrostatskih interakcija. Priprava ovakvih polimera je jednostavna, a kao nanočestice vrlo lako mogu ući u stanicu endocitozom (Lam i sur. 2015). PEI (engl. *Polyethylenimine*) je trenutno najviše korišteni kationski polimer za siRNA molekulu. Njegove amino skupine su protonirane tako da može stvarati interakcije s negativno nabijenom nukleinskom te može izbjeći endosom i zaštititi nukleinsku kiselinu od kiselog pH. Drugi kationski polimer koji se koristi u isporuci nukleinskih kiselina je „chitosan“ (CS) koji ne može efikasno izbjeći endosom i pritom zaštititi nukleinsku kiselinu. Sprječavanje ulaska u endosom može se poboljšati korištenjem histidinskog konjugata ili dodatkom slobodnog CS prije ili poslije transfekcije (Zahir i sur. 2018).

## 8. siRNA I miRNA U KLINIČKIM ISTRAŽIVANJIMA

### 8.1. Tumor

Postoje tri RNAi genetske mete za kliničku terapiju tumora. To su geni koji čine dio staničnih puteva usko povezanih s tumorom, geni koji su otporni na radio ili kemoterapije imaju te geni koji imaju važnu ulogu u interakcijama tumora sa stanicama domaćina. Važne mete su i onkogeni koji su najčešće povezani s malignim preobrazbama te su mutirani ili potječu od preslagivanja kromosoma te onkogeni koji su uneseni za transformaciju virusa u ljudskim tumorima (Grimm i Kay 2007). Utišavanjem ovakvih gena inhibira se rast stanica tumora, metastaza, angiogeneza i inhibira se otpornost tumora na lijekove. siRNA molekule dobri su terapeutici u personaliziranoj medicini upravo zbog njihove specifičnosti te se koriste kod terapije bolesti kao što su hemofilija i nasljedne amiloidoze (Lam i sur. 2015). Pošto miRNA molekule imaju sposobnost utišavanja nekoliko ciljnih gena mogu, prema tome, mogu utišati više gena različitih tumora. No, tumori nisu jedina meta ovih malih terapeutskih molekula te se njihovim korištenjem mogu liječiti različite bolesti i poremećaji, ali ipak, zbog zloćudnosti, najviše je zastupljeno liječenje tumora (Slika 8) (Young i sur. 2015).



Slika 8. Terapeutske indikacije siRNA i miRNA terapeutika (Preuzeto i prilagođeno prema Lam i sur. 2015).

## 8.2. siRNA i tumor

siRNA molekule se mogu usmjeriti protiv tumora koji upravljaju nekontroliranom proliferacijom stanica. Primjeri ovakvih meta su: ciklin ovisne kinaze (CDK, engl. *cyclin dependent kinases*), vaskularni endotelni faktori rasta (VEGF, engl. *vascular endothelial growth factors*), inzulinski faktori rasta (IGF, engl. *insulin growth factors*), i faktori antiapoptoze (engl. *anti-apoptotic factors*). CKD regulira važne točke staničnog ciklusa te ako se njegova ekspresija poremeti tada može doći do poremećaja staničnog ciklusa što pridonosi razvoju tumora. Ciklin B1 je povezan s tumorima bubrega i dojke te se siRNA može koristiti kako bi se utišala ekspresija ciklina B1 kako ne bi došlo do pojave navedenih tumora (Young i sur. 2015). Važan proces koji potiče preživljavanje i rast tumora naziva se angiogeneza. Jedan od regulatora ovog procesa je VEGF te je upravo on jedan od važnih meta za inhibiciju angiogeneze tumora. ALNVSPo2 je siRNA terapeutik koji je nošen lipidnim nanočesticama i potiskuje protein staničnog ciklusa, KSP (vretenasti kinezin protein), da bi, na kraju, potaknuo smrt stanice. Također, potiče i supresiju VEGF faktora (Lam i sur. 2015). Nadalje, CALAA-01 je inhibitor tumora koji cilja M2 podjedinicu ribonukleotidne reduktaze (RRM2). Ovaj protein je uključen u replikaciju i važan je kod završetka dijeljenja stanica. RRM2 regulira Bcl-2 kod različitih tumora, posebice tumora pluća, vrata i glave. Bcl-2 ima važnu ulogu u napredovanju tumora. Upravo anti-RRM2 siRNA može spriječiti proliferacijsku aktivnost (Chakraborty i sur. 2017). Do sad su otkriveni i mnogi drugi siRNA terapeutici kao što je siG12D LODER koji cilja mutirane KRAS onkogene (engl. *Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog*) za liječenje tumora slezene, DCR-MYC, DICER supstrat siRNA koji cilja MYC onkogene za liječenje različitih tipova tumora ili siRNA-EphA2-DOPC koji cilja EphA2 (engl. *EPHA2 - Ephrin type-A receptor 2 precursor*) gene koji su povezani s tumorom (Lam i sur. 2015).

## 8.3. miRNA i tumor

miRNA molekule mogu se ponašati ili kao onkogeni (oncomiR) ili kao supresori tumora (tumor supresorske miRNA). miR-21 je oncomiR koji se ponaša kao onkogen kod prevelike ekspresije u različitim tipovima stanica tumora. Prevelika ekspresija rezultira

regresijom tumora ako ne dolazi do supresije miRNA molekulom. Tako inhibicija miR-21 molekule aktivira kaspaze koje vode do apoptoze. Nadalje, miR-142 je tumor supresorski onkogen lociran na 17. kromosomu i uzrokom je agresivnog B-CLL (engl. *B-cell chronic lymphocytic leukemia*) tumora zbog t translacije MYC gena prema uzvodnom promotoru. Rezultat je gubitak regije od 20 nukleotida prisutnih nizvodno od miR-142 prekursora koji remeti procesiranje miRNA i dovodi do prevelike ekspresije MYC gena. MYC je odgovoran za tranziciju staničnog ciklusa te ukoliko je previše eksprimiran dolazi do neprekidne angiogeneze (Mishra i sur. 2015). No, osim navedenih, za puno supresorskih miRNA molekula kao što je miRNA-7, miRNA-126, miRNA-143/145, miRNA-200, miRNA-355 i članovi obitelji let-740 se utvrdilo da su u mogućnosti potisnuti onkogene (Lam i sur. 2015). Postoje i tzv. cirkulirajuće miRNA u transformaciji fibroblasta koji su uključeni u nekoliko staničnih mehanizama. Niska ekspresija miR-31 i miR-214 molekula te visoka ekspresija miR-155 molekule čini ih djelom reprogramiranja fibroblasta koji su u stanju mirovanja prema fibroblastima koji su povezani sa karcinomom jajnika. miR-214 cilja CCL5 (kemokin koji je važan za funkciju CAF-a). miR-31 cilja gen SATB2 koji je odgovoran za remodulaciju kromosoma i regulaciju ekspresije gena kod fibroblasta povezanih s karcinomom jajnika (Shah i sur. 2016).

## 9. ZAKLJUČAK

Male RNA molekule (siRNA/shRNA/miRNA) imaju veliki potencijal utišavanja ciljnih gena posredovanjem u biološkom procesu RNA interferencije. Iako se njihovi mehanizmi djelovanja razlikuju, ishod mehanizama je isti. Također, kako bi se ove molekule mogle primjenjivati u kliničke svrhe, moraju se riješiti problemi njihove slabe stabilnosti in vivo, isporuke ovih molekula te problemi prolaska kroz stanične barijere na koje nailaze na putu do ciljnih stanica. Prema tome, moraju se dizajnirati sintetičke molekule kako bi se reducirali neželjeni efekti do kojih dolazi zbog navedenih problema. Najveći napredak u rješavanju tih prepreka daju kemijske modifikacije ovih terapijskih molekula, kao i pomno dizajniranje sintetičkih siRNA/shRNA/mRNA molekula s poboljšanim karakteristikama te vektoru (pogotovo nevirusni) za isporuku molekula u ciljne stanice. Ovakve molekule imaju široku potencijalnu primjenu u liječenju mnogih bolesti, od kojih su tumori u samom centru istraživanja. Do danas se razvilo mnogo siRNA i mRNA molekula koje su u istraživanjima

korištene u liječenju različitih tumora, a rezultati su pokazali da će ovakve terapije imati široku primjenu u bliskoj budućnosti.

## 10. LITERATURA

Carthew, R.W., Sontheimer, E.J. (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136: 642-655.

Chakraborty, C., Sharma, A.R., Sharma, G., Doss, C.G.P., Lee, S. (2017) Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from Bench to Clinic as Next Generation Medicine. *Molecular Therapy: Nucleic acids* 8: 132-143.

Fish, R.J., Kruithof, E.K. (2004) Short-term cytotoxic effects and long-term instability of RNAi delivered using lentiviral vectors. *BMC Molecular Biology* 5: 9.

Gao, K., Huang, L. (2013) Achieving efficient RNAi therapy: progress and challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 3(4): 213-225.

Grimm, D. (2009) Small silencing RNAs: State-of-the-art. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61: 672-703.

Grimm, D., Kay, M.A. (2007) RNAi and gene therapy: a mutual attraction. *Hematology American Society Hematology Education Program* 473-481.

Grimm, D., Streetz, K.L., Jopling, C.L., Storm, T.A., Pandey, K., Davis, C.R., Marion, P., Salzar, F., Kay, M.A. (2006) Fatality in mice due to the oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441: 537-541.

Ku, S.H., Jo, S.D., Lee, Y.K., Kim, K., Kim, S.H. (2015) Chemical and structural modifications of RNAi therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 104: 16-28.

Lam, J. KW., Chow, M.Y.T., Zhang, Y., Leung, S. WS (2015) siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Official journal of the American Society of Gene & Cell Therapy* 4: e252.

Mishra, S., Yadav, T., Rani, V. (2015) Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 98: 12-23.

Pekarik, V. (2005) Design of shRNAs for RNAi—A lesson from pre-miRNA processing: Possible clinical applications. *Brain Research Bulletin* 68: 115-120.

Rao, D. D., Vorhies, J. S., Senzer, N., Nemunaitis, J. (2009) siRNA vs. shRNA: Similarities and differences. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61: 746-759.

Ros, X.B-D., Gu, S. (2016) Guidelines for the optimal design of miRNA-based shRNAs. *Methods* 103: 157-166.

Sarret, S.M., Nelson, C.E, Duvall, C.L. (2015) Technologies for controlled, local delivery of siRNA. *Journal of Controlled Release* 218: 94-113.

Shah, M. Y., Ferrajoli, A., Sood, A.K., Lopez-Berestein, G., Calin, G. A. (2016) microRNA Therapeutics in Cancer - An Emerging Concept. *Ebiomedicine* 12: 34-42.

Takahashi, Y., Nishikawa, M., Takakura, Y. (2009) Nonviral vector-mediated RNA interference: Its gene silencing characteristics and important factors to achieve RNAi-based gene therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61: 760-766.

Young, S.W.S., Stenzel, M., Yang, J. (2015) Nanoparticle-siRNA: A potential cancer therapy? *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 98: 159-169.

Zahir, F., Mottaghitab, F., Dinarvand, M., Atyabi, F. (2018) siRNA delivery for treatment of degenerative diseases, new hopes and challenges. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 45: 428-441.

Web 1:Wikipedia: Small interfering RNA,  
[https://en.wikipedia.org/wiki/Small\\_interfering\\_RNA](https://en.wikipedia.org/wiki/Small_interfering_RNA)(9.7.2018)

Web 2: Open i: miRNAs: biological and clinical determinants in epilepsy,  
[https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC4602137\\_fm01-08-00059-g0001&req=4](https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC4602137_fm01-08-00059-g0001&req=4) (9.7.2018)

Web 3: ResearchGate:[https://www.researchgate.net/figure/Simplified-diagram-of-siRNA-and-shRNA-processing-to-facilitate-gene-knockdown-The\\_fig1\\_271852989](https://www.researchgate.net/figure/Simplified-diagram-of-siRNA-and-shRNA-processing-to-facilitate-gene-knockdown-The_fig1_271852989)(4.6.2018.)

Web 4:Springer Link: Personalized Cancer Approach: Using RNA Interference Technology, <https://link.springer.com/article/10.1007/s00268-011-1100-0> (4.6.2018.)